

Chemische Untersuchungen über die Lebermitochondrien

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophischen Fakultät II der
Universität Zürich

von

BRUNO EXER

dipl. ing. chem. ETH.

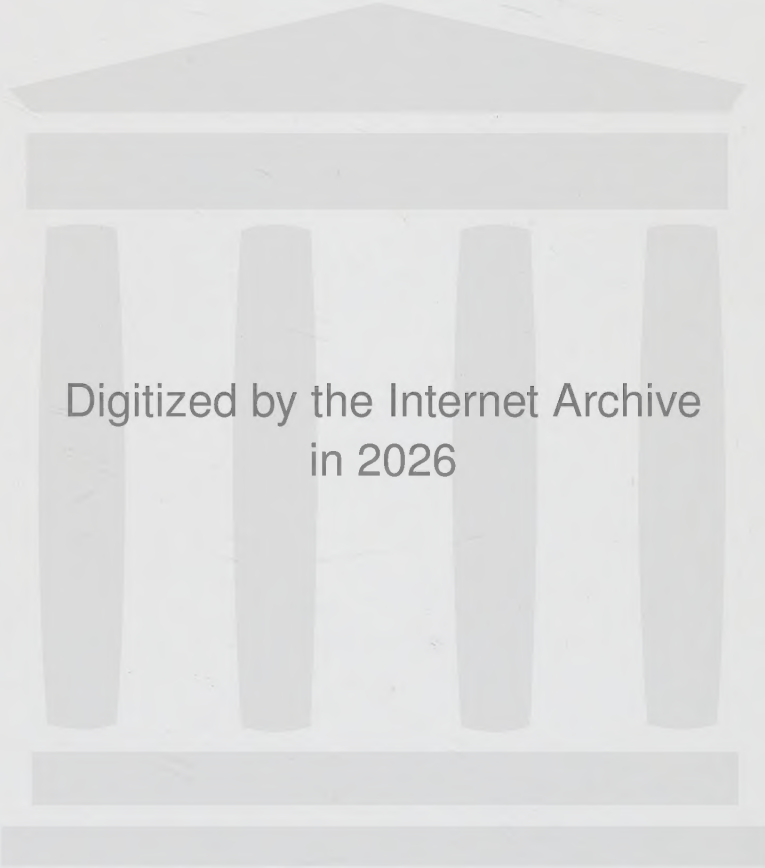
von Seedorf (Uri)

Begutachtet von den Herren

Prof. Dr. PAUL KARRER und Prof. Dr. F. LEUTHARDT

ZÜRICH 1953

Buchdruckerei E. Birkhäuser & Cie. AG., Basel



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Chemische Untersuchungen über die Lebermitochondrien

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophischen Fakultät II der
Universität Zürich

von

BRUNO EXER

dipl. ing. chem. ETH.

von Seedorf (Uri)

Begutachtet von den Herren

Prof. Dr. PAUL KARRER und Prof. Dr. F. LEUTHARDT

ZÜRICH 1953

Buchdruckerei E. Birkhäuser & Cie. AG., Basel

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. F. LEUTHARDT,

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Zürich ausgeführt wurde, danke ich herzlich für seine vielen Anregungen und die unermüdliche Unterstützung.



INHALTSVERZEICHNIS

A. *Untersuchungen über die Ribosenukleinsäure und den Lipidanteil (Steroide) der Lebermitochondrien.*

I. Teil: Ribosenukleinsäure aus Mitochondrien.

Experimenteller Teil:

I. Methoden:

- A. Analytische Methoden.
- B. Hydrolyse und Papierchromatographie.
- C. Berechnung der Molverhältnisse.
- D. Darstellung von Mitochondrien und Mikrosomen.

II. Ergebnisse:

- A. Aufarbeitung der Mitochondrien.
- B. Extraktion der Ribosenukleinsäure aus entfetteten Mitochondrien.
- C. Aufarbeitung der Mikrosomen.

II. Teil: Untersuchungen über den Lipidanteil der Lebermitochondrien.

B. *Über den Einfluss des Methylenblaus auf die Atmung der Lebermitochondrien.*

Sonderabdruck aus
„Helvetica chimica acta“
Volumen **36**, Fasciculus secundus, 1953.

Untersuchungen über die Ribosenukleinsäure und den Lipidanteil (Steroide) der Lebermitochondrien

I. Teil: Ribosenukleinsäure aus Mitochondrien.

In den meisten Zellen scheint die gesamte Ribosenukleinsäure des Cytoplasmas an Strukturelemente gebunden zu sein, die durch fraktionierte Zentrifugation aus den Gewebshomogenaten abgetrennt werden können. Ein Teil findet sich in den mikroskopisch sichtbaren Zellgranula („large granules“), die im wesentlichen mit den Mitochondrien identifiziert werden können, ein anderer Teil in den ultramikroskopischen sog. Mikrosomen (*Claude*¹⁾). Die Zusammensetzung, Eigenschaften und Funktionen der Mitochondrien und Mikrosomen sind in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Eine scharfe Grenze zwischen den beiden Arten von Teilchen lässt sich auf Grund der fraktionierten Zentrifugation nicht festsetzen.

Die grossen Teilchen sind ausserordentlich reich an Fermenten. So enthalten die Mitochondrien der Leber und der Niere das gesamte Enzymsystem des Citronensäurecyklus und der oxydativen Phosphorylierung, und ausserdem sind eine ganze Reihe weiterer Fermente in ihnen nachgewiesen worden. Die Fermentausrüstung der Mikrosomen ist viel ärmer.

Es stellt sich die Frage, ob zwischen den grossen und den kleinen Teilchen des Cytoplasmas ein genetischer Zusammenhang besteht. Dieses Problem ist vor allem von der Schule *Brachet's*²⁾ studiert worden. Die Analyse der durch fraktionierte Zentrifugation bei hohen Tourenzahlen gewonnenen Mikrosomen zeigt, dass die Teilchen um so

¹⁾ *A. Claude*, J. exp. Med. **80**, 19 (1944); **84**, 51 (1946); Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **9**, 263 (1941).

²⁾ *J. Brachet & R. Jeener*, Enzymologia **11**, 196, 222 (1943); *J. Brachet & H. Chantrenne*, Acta biol. Belg. **2**, 451 (1942); *H. Chantrenne*, Enzymologia **11**, 213 (1943).

reicher an Ribosenukleinsäure sind, je schwerer zentrifugierbar, d. h. je kleiner sie sind. Durch Behandeln mit *Edsall'scher* Lösung (alkalische Lösung von KCl) lassen sich aus den Mitochondrien ultramikroskopische Teilchen gewinnen, bei welchen der gleiche Zusammenhang zwischen Nukleinsäuregehalt und Teilchengrösse besteht wie bei den präformierten Mikrosomen (*Jeener*¹⁾ und *Chantrenne*²⁾). Die Autoren vermuten daher, dass die Mitochondrien unter Einschluss anderer Proteine aus Mikrosomen aufgebaut werden, und dass die verschiedenen Fraktionen von Zellgranula verschiedene Entwicklungsstadien von Lipoproteidkomplexen darstellen, die sich um einen nukleinsäurereichen Kern bilden. Bei unseren eigenen Versuchen haben wir gefunden, dass das Verhältnis Nukleinsäure-P: Lipid-P: Phosphoprotein-P in den Mikrosomen und den Mitochondrien annähernd den gleichen Wert hat (vgl. Tab. 3 und 4). Diese Beobachtung ist mit der Annahme vereinbar, dass die Mikrosomen in den Aufbau der grösseren Teilchen einbezogen werden, doch ist das bisherige Beobachtungsmaterial zu dürftig, um daraus sichere Schlüsse auf den Zusammenhang zwischen Mitochondrien und Mikrosomen zu ziehen. Eine weitere Möglichkeit für die Aufklärung der Beziehungen zwischen den verschiedenen Teilchenfraktionen ergibt sich aus der Verfolgung des Einbaues von Radiophosphor in die Ribosenukleinsäure. Derartige Untersuchungen sind von *Barnum & Huseby*³⁾ und *Jeener & Szafarz*⁴⁾ durchgeführt worden. Sie fanden, dass radioaktives Phosphat mit ungefähr gleicher Geschwindigkeit in die „large granules“ und die Mikrosomen der Mäuseleber aufgenommen wird. Auch dieser Befund lässt keinerlei Schlüsse auf die mögliche genetische Beziehung zwischen Mikrosomen und Mitochondrien zu.

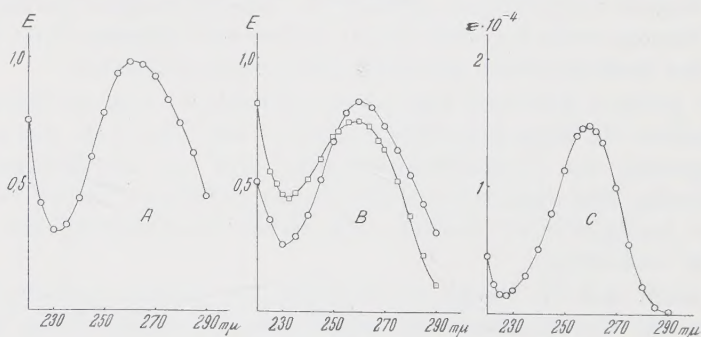


Fig. 1.

UV.-Absorptionsspektren: A) Ribosenukleinsäure aus Mitochondrien in 1-n. HClO_4 . B) Hefenukleinsäure $\square$ — $\square$ in Wasser, $\circ$ — $\circ$ in 1-n. HClO_4 . C) Adenosin-3-phosphat in 0,1-n. NH_4OH .

¹⁾ R. Jeener, Biochim. Biophys. Acta **2**, 633 (1948).

²⁾ H. Chantrenne, Biochim. Biophys. Acta **1**, 437 (1947).

³⁾ C. P. Barnum & R. A. Huseby, Arch. Biochem. **29**, 7 (1950).

⁴⁾ R. Jeener & D. Szafarz, Exper. **6**, 60 (1950).

Wenn die Mikrosomen in den Aufbau der Mitochondrien einbezogen werden, so ist anzunehmen, dass ihre Nukleinsäuren dieselbe Zusammensetzung aufweisen wie diejenigen der Mitochondrien. Jedenfalls würde ein wesentlicher Unterschied im Gehalt der einzelnen Bausteine bedeuten, dass die Mikrosomen nicht als solche am Aufbau der Mitochondrien beteiligt sind.

Aber auch abgesehen von diesem speziellen Problem bietet die Kenntnis der Zusammensetzung der Nukleinsäuren in morphologisch gut definierten Zellbestandteilen ein selbständiges Interesse. Es ist die Hypothese aufgestellt worden, dass die Ribosenukleinsäuren des Cytoplasmas organspezifisch sind, während die Desoxyribosenukleinsäuren des Kerns artspezifisch sein sollen. In Anbetracht der raschen Umsetzung und Erneuerung der Ribosenukleinsäure, wie sie sich in tracer-Versuchen manifestiert, entsteht auch die Frage, ob ihre Zusammensetzung unter allen Umständen konstant bleibt.

Es sind in den letzten Jahren verschiedene chromatographische Methoden entwickelt worden, die es gestatten, die nach partieller Hydrolyse auftretenden Bruchstücke zu trennen und das Verhältnis der verschiedenen Purin- und Pyrimidinbasen (*Chargaff* u. Mitarbeiter¹), *Markham & Smith*²)³), *Cohn*⁵) & *Carter*⁶)), zu bestimmen.

Wir haben daher im Rahmen unserer Untersuchungen über die Lebermitochondrien eine Analyse der Nukleinsäuren der Lebermitochondrien und -mikrosomen unternommen. Das unmittelbare Ziel der vorliegenden Arbeit ist zunächst ein methodisches. Wir haben verschiedene Methoden für die Extraktion und chromatographische Bausteinanalyse miteinander verglichen, um eine Grundlage für die spätere systematische Untersuchung an einem grösseren Material zu gewinnen. Wir haben dabei auf morphologisch einheitliches Ausgangsmaterial, d. h. eine möglichst saubere Trennung von den Mitochondrien und Mikrosomen von den übrigen Zellbestandteilen Wert gelegt. Dies bedeutet für die chemische Analyse eine gewisse Einschränkung, weil solches Material nicht in beliebigen Mengen beschafft werden kann.

Als Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen dienten Mitochondriensuspensionen aus Rattenleber, welche nach der Mannitmethode (*Leuthardt & Müller*⁷)) dargestellt worden waren. Sie erwiesen

¹) *E. Chargaff, B. Magasanik, E. Vischer, C. Gran, R. Doniger & D. Elson, J. Biol. Chem.* **186**, 51 (1950); *E. Vischer & E. Chargaff, J. Biol. Chem.* **176**, 703, 715 (1948); *B. Magasanik, E. Vischer & E. Chargaff, J. Biol. Chem.* **186**, 37 (1950).

²) *J. D. Smith & R. Markham, Biochem. J.* **46**, 509 (1950).

³) *R. Markham & J. D. Smith, Biochem. J.* **49**, 401 (1951).

⁴) *R. Markham & J. D. Smith, Biochem. J.* **46**, 513 (1950).

⁵) *W. E. Cohn, Am. Soc.* **71**, 2275 (1949); **72**, 1471, 2811, 4273 (1950).

⁶) *C. E. Carter, Am. Soc.* **72**, 1466 (1950).

⁷) *F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper.* **4**, 278 (1948).

sich bei der Betrachtung im Phasenmikroskop als weitgehend einheitlich, d. h. sie enthielten Kerne oder Zelltrümmer nicht in wesentlicher Menge. Die Mikrosomenfraktion wurde durch Zentrifugieren des Überstehenden bei hoher Tourenzahl erhalten (*Claude*¹) u. a.²⁾).

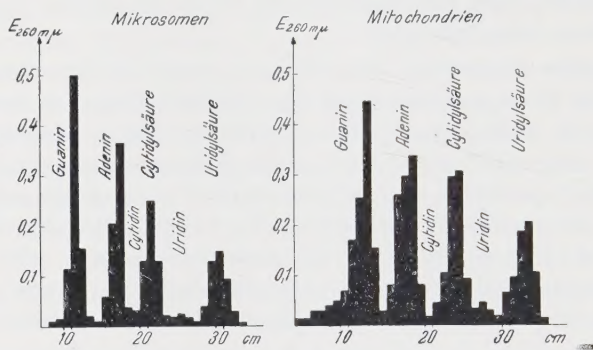


Fig. 2.

Für die Extraktion der Nukleinsäuren aus den Geweben sind eine Reihe von verschiedenen Methoden vorgeschlagen worden. Sie lassen sich durch Perchlorsäure (*Ogur & Rosen*³⁾), heisse Trichloressigsäure (*Schneider*⁴⁾) oder wässrige Salzlösungen extrahieren (*Davidson & Waymouth*⁵⁾). Wie wir gefunden haben, lassen sich die Nukleinsäuren auch durch Behandlung der Gewebe mit konzentrierten Harnstofflösungen gewinnen. Die Methode gestattet, wie der Vergleich mit der Extraktion durch Perchlorsäure bei 80° zeigt, schon bei einmaliger Extraktion etwa 90 % der Nukleinsäure in Lösung zu bringen.

Die Extraktion mit heisser Trichloressigsäure nach *Schneider*⁴⁾ eignet sich nur für analytische Zwecke, nicht aber für die präparative Darstellung der Nukleinsäuren. Bei Verwendung der Perchlorsäure tritt offenbar weitgehende Depolymerisation ein.

Bedeutend schonender ist die Extraktion mit konzentrierter Harnstofflösung. Allerdings gehen dabei beträchtliche Mengen Proteine als Nukleoprotein mit in Lösung. Sie können nach der Methode von *Sevag*⁶⁾ entfernt werden. Wir haben in der vorliegenden Untersuchung die Extraktion mit Kochsalz, Harnstoff und Perchlorsäure verwendet.

¹⁾ A. Claude, J. exp. Med. **80**, 19 (1944); **84**, 51 (1946); Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **9**, 263 (1941).

²⁾ G. H. Hogeboom, A. Claude & R. D. Hotchkiss, J. Biol. Chem. **165**, 615 (1946); G. H. Hogeboom, W. C. Schneider & G. E. Pallade, J. Biol. Chem. **172**, 619 (1948); E. P. Kennedy & A. L. Lehninger, J. Biol. Chem. **179**, 957 (1949).

³⁾ M. Ogur & G. Rosen, Arch. Biochem. **25**, 262 (1950).

⁴⁾ W. C. Schneider, J. Biol. Chem. **161**, 293 (1945).

⁵⁾ J. N. Davidson & C. Waymouth, Biochem. J. **38**, 39, 375, 379 (1944).

⁶⁾ M. G. Sevag, D. B. Lackman & J. Smolens, J. Biol. Chem. **124**, 425 (1938).

Die Resultate der chromatographischen Analyse unserer Nukleinsäurepräparate aus Mitochondrien und Mikrosomen sind in Tab. 5 dargestellt.

Eine wichtige Fehlerquelle bei der Bestimmung der Bausteine liegt in der Überschneidung der Fraktionen, wie sie besonders bei der Papierchromatographie durch „tailing“ zustandekommen kann. Man erhält aus den zwischen den Maxima liegenden Abschnitten des Chromatogramms immer Mischfraktionen. Durch Messung der Extinktion bei zwei verschiedenen Wellenlängen lässt sich der Gehalt dieser Mischfraktionen an jeder Komponente angenähert bestimmen (vgl. exp. Teil). Der Fehler, der in unseren Versuchen durch Überschneidung der Fraktionen entsteht, ist nicht sehr gross, weil die Trennung gut ist (vgl. Fig. 2). „Hängenbleiben“ der schneller wandernden Fraktionen verschiebt die Verhältniszahlen zugunsten der langsamer wandernden. Der Fehler der in der Tab. angegebenen Verhältniszahlen kann nach der bekannten Formel $\Delta x = \pm (b \cdot \Delta a - a \cdot \Delta b) : b^2$ abgeschätzt werden (Δx = maximaler Fehler des Quotienten $a:b$). Wenn man den Fehler für die Bestimmung der einzelnen Fraktion etwa zu 10% im Maximum ansetzt, so kann für $a:b \sim 1$ der maximale Fehler des Quotienten etwa 20% erreichen. Wie die Parallelbestimmungen der Tab. 5 zeigen, ist wahrscheinlich der tatsächliche Fehler wesentlich kleiner.

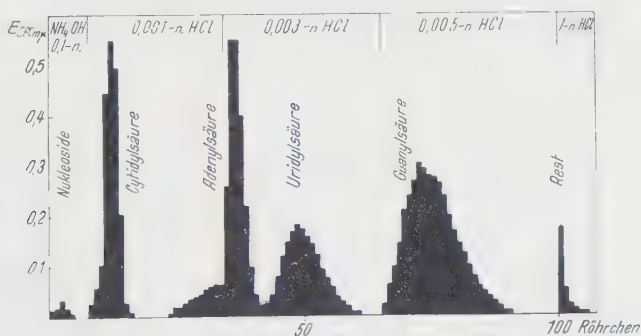


Fig. 3.

Die Zahlen der Tab. 5 bestätigen zunächst die besonders von (Chargaff¹)²) hervorgehobene Tatsache, dass die Nukleinsäuren nicht nach dem Tetranukleotidprinzip gebaut sind; das Verhältnis der 4 Basen weicht mehr oder weniger stark von der Einheit ab. Im übrigen zeigen die Werte aus den verschiedenen Präparaten beträchtliche Schwankungen, die teilweise sicher über die methodischen Fehler herausgehen. Das Verhältnis Purine:Pyrimidine lässt sich in den Rohextrakten angenähert ermitteln, wenn man die Extinktion bei 260 m μ

¹) E. Chargaff, Exper. **6**, 201 (1950).

²) B. Magasanik & E. Chargaff, Biochim. Biophys. Acta **7**, 396 (1951).

misst und die Ribose nach der Orcinmethode (nach *Mejbaum*¹⁾) bestimmt (siehe exp. Teil). Man findet auf diese Weise einen Wert von etwa 1,26. Wie die Tab. zeigt, ergab die chromatographische Analyse für das gleiche Verhältnis Werte zwischen 1,22 und 1,57 (abgesehen von der Fraktion Ba-3, die aber nicht mit den anderen verglichen werden kann; vgl. exp. Teil). Es ist dabei zu beachten, dass jedes „Hängenbleiben“ der schnelleren Fraktionen (Cytidyl- und Uridylsäure) das Verhältnis Pu:Py vergrössern muss.

Die stärksten Unterschiede im Verhältnis Guanin:Adenin gegenüber den Kochsalz- und Harnstoffextrakten zeigt die durch Perchlorsäureextraktion gewonnene Fraktion Ba-1, und zwar sowohl bei der Papierchromatographie als auch bei der Trennung an der Austauschersäule. Das Verhältnis der beiden Purinbasen ist hier G:A $\sim$ 2, während bei den anderen Extraktionsmethoden die Werte zwischen 1,1 und 1,3 liegen. Sehr wahrscheinlich findet bei der Extraktion mit Perchlorsäure eine beträchtliche Depolymerisation und Abspaltung von Adenin statt. Auf eine Depolymerisation kann man auch daraus schliessen, dass im Perchlorsäureextrakt das Minimum der Absorptionskurve (230 m μ) tiefer liegt als bei den Nukleinsäuren²⁾. Bei 230 m μ ist die Extinktion der einfachen Nukleotide bedeutend geringer als diejenige der Nukleinsäuren (siehe Fig. 1); das Verhältnis $E_{260\text{ m}\mu}:E_{230\text{ m}\mu}$ nimmt also beim Abbau der Nukleinsäuren zu.

Ziemlich starken Schwankungen ist auch das Verhältnis Uracil:Cytosin unterworfen (0,54 bis 0,83). Der niedrige Wert im Perchlorsäureextrakt lässt darauf schliessen, dass wahrscheinlich auch etwas Uracil bei der Aufarbeitung verloren geht.

Es werden also unter der Einwirkung von Perchlorsäure die Bindungen des Adenins und an zweiter Stelle des Uracils leicht gelöst. Die grösste Konstanz zeigt das Verhältnis Guanin:Cytosin.

Auffallend ist die Diskrepanz des Quotienten U:C in verschiedenen durch Harnstoffextraktion gewonnenen Präparaten. Da die Analysen aus gleichen Präparaten gut übereinstimmende Werte ergeben, muss es sich um reelle Unterschiede der untersuchten Präparate handeln. Die Verhältnisse G:C und A:C zeigen keine über die Fehlergrenze der Methode hinausgehenden Schwankungen; andererseits ist im Präparat mit dem niedrigen Wert auch das Verhältnis Purin:Pyrimidin grösser (1,55 statt 1,18). Dasselbe gilt auch für den Kochsalzextrakt mit dem kleineren U:C-Quotienten. Das Präparat enthält also tatsächlich weniger Uracil. Wir können zur Zeit nicht sagen, ob bei der Aufarbeitung ein Verlust eingetreten ist (z. B. während der wiederholten Behandlung bei 4° nach *Sevag*³⁾) oder ob tatsächlich die

¹⁾ *W. Mejbaum*, Z. physiol. Ch. **258**, 117 (1939).

²⁾ *R. Markham & J. D. Smith*, Biochem. J. **46**, 513 (1950).

³⁾ *M. G. Sevag, D. B. Lackman & J. Smolens*, J. Biol. Chem. **124**, 425 (1938).

Zusammensetzung der Lebernukleinsäure variieren kann. Die Frage lässt sich erst durch die Untersuchung eines grösseren Materials entscheiden.

Wegen Mangel an Material konnten nur wenige Analysen der Mikrosomen durchgeführt werden. Die Verteilung der Bausteine zeigt ein ähnliches Bild wie bei den Mitochondrien, doch sind die vorliegenden Resultate zu dürftig, um einen Vergleich anzustellen.

*Magasanik & Chargaff*¹⁾ haben kürzlich Bausteinanalysen der Ribosenukleinsäure aus Schweinsleber mitgeteilt (siehe Tab. 1).

Ein ähnliches Verhältnis ergibt sich auch aus den Analysen von *Volkin & Carter*²⁾. Diese Autoren haben nach Entfernung der Desoxyribosenukleinsäure als Proteinkomplex die Ribosenukleinsäure durch Guanidinhydrochlorid ausgefällt. Unter diesen Bedingungen ist der grösste Teil des Gewebes löslich. Die Nukleotide wurden an der Austauschersäule getrennt. In der folgenden Tab. sind die von den genannten Autoren gewonnenen Analysenzahlen unseren Resultaten gegenübergestellt.

Tabelle 1.

Zusammensetzung der Lebernukleinsäuren bei verschiedenen Tierarten.

Tierart	G	A	C	U	Pu Py	Autor
Schwein	1,03	0,62	1	0,47	1,12	<i>Chargaff</i> ¹⁾ <i>Volkin & Carter</i> ²⁾
Kalb	1,20	0,67	1	0,56	1,20	
Kaninchen	1,19	0,59	1	0,59	1,12	
Maus	1,26	0,78	1	0,67	1,22	
Ratte	0,97	0,53	1	0,45	0,97	
Ratte (Mitoch.)						Eigene Analyse
HClO ₄ -Extr. Ba-1	1,3	0,66	1	0,66	1,18	
NaCl-Extrakt	1,26	1,14	1	0,56	1,56	
Harnstoffextrakt I	1,36	1,04	1	0,56	1,55	
Harnstoffextrakt II	1,24	0,93	1	0,82	1,18	

Die Zusammensetzung unserer Fraktion Ba-1 (aus Perchlorsäureextrakt gewonnen) ist nicht wesentlich verschieden von derjenigen, die andere Autoren mitgeteilt haben. Bei Extraktion mit Kochsalz- oder Harnstofflösung finden wir durchwegs für Adenin höhere Werte. Es wäre möglich, dass bei diesen Extraktionsmethoden eine besonders labile Fraktion mit Adennukleotiden erhalten wird, die in den anderen Präparaten nicht mehr vorhanden ist. Die Frage kann erst an Hand eines umfangreicheren Materials gelöst werden.

Wir können unsere Erfahrungen dahin zusammenfassen, dass die chromatographische Methode für die Analyse kleiner Mengen von Nukleinsäuren sehr gut geeignet ist und bei Beobachtung gewisser

¹⁾ *B. Magasanik & E. Chargaff*, Biochim. Biophys. Acta **7**, 396 (1951).

²⁾ *E. Volkin & C. E. Carter*, Am. Soc. **73**, 1516 (1951).

Kautelen für die einzelnen Bausteine Werte liefert, die innerhalb weniger Prozente genau sind. Viel schwieriger ist die Aufgabe, die Nukleinsäuren aus den Geweben ohne Veränderung und ohne Verlust einzelner Bausteine für die Analyse zu gewinnen. Von den Methoden, die wir verwendet haben, scheint sich die Extraktion mit Kochsalz- oder mit konzentrierten Harnstofflösungen am besten zu eignen. Doch müssen in Anbetracht der grossen Labilität gewisser Bindungen alle Analysen, besonders was den Gehalt an Adenin und Uracil betrifft, mit Vorsicht bewertet werden. Es scheint, dass in der Leber Nukleinsäuren vorkommen, welche etwas mehr Adenin und Uracil enthalten, als die bisher beschriebenen Präparate.

Experimenteller Teil.

I. Methoden.

A. Analytische Methoden.

Phosphatbestimmung nach *Fiske & Subbarow*¹⁾ unter folgender Modifikation: Als Reduktionsmittel wurde eine 1-proz. Ascorbinsäurelösung verwendet. Die Farbentwicklung wurde während 7 Min. im Wasserbad bei 37° vorgenommen und die Extinktion bei 750 m μ abgelesen. Zur Bestimmung des Gesamtphosphates wurde die organische Substanz mit Perchlorsäure verascht.

Das Gewicht der Phospholipide wurde aus dem Phosphorgehalt der Lipide berechnet ($P \times 25$).

Ribosebestimmung nach *Mejbaum*²⁾, Modifikation nach *Albaum & Umbreit*³⁾. Es wurde 45 Min. auf 100° erhitzt. Die Extinktion wurde bei 665 m μ unter Benutzung von destilliertem Wasser als Leerwert gemessen. Als Ferrisalze wurde Eisenammoniumalaun (0,1-proz.) in konzentrierter Salzsäure verwendet. Endvolumen 6 cm³. Unter diesen Bedingungen betrug die Molekularextinktion der Ribose ziemlich genau $E_{665 \text{ m}\mu} = 4 \cdot 10^3$ bei einer Schichtdicke von 1 cm.

Die beiden isomeren Adenylsäuren geben bei dieser Methode verschiedene Werte für die Molekularextinktion. Der Wert für Adenosin-5-phosphat liegt regelmässig höher als derjenige für Ribose und Ribose-3-phosphat. Dieser Unterschied ist hier belanglos, weil bei unserer Hydrolysemethode kein Adenosin-5-phosphat entsteht. Nach *Albaum & Umbreit*³⁾ wird bei Behandlung von Adenosin-5-phosphat mit HCl-Orcin-Fe^{III} die Hälfte der maximalen Farbtiefe schon nach wenigen Min. erreicht, während bei Adenosin-3-phosphat oder Ribose die Farbentwicklung etwas langsamer verläuft. Wir haben im Hydrolysat unserer Nukleinsäurepräparate die Entwicklung der Farbe verfolgt. Sie entsprach derjenigen der freien Ribose.

B. Hydrolyse und Papierchromatographie.

Für die saure Hydrolyse folgten wir der Methode von *Smith & Markham*⁴⁾. Die Fraktionen, deren Darstellung unten beschrieben wird, wurden teilweise mit 1-n. Salzsäure eine Stunde bei 100°, teilweise mit Natronlauge 24 Std. bei pH 12,4 und 36° (Methode von *Chargaff*⁵⁾), hydrolysiert. Wie *Smith & Markham*⁴⁾⁶⁾ nachgewiesen haben, entstehen bei der sauren Hydrolyse neben Cytidyl- und Uridylsäure geringe Mengen (ca. 5%) der entsprechenden Nukleoside. Das Cytidin liegt im Chromatogramm zwischen Adenin und

¹⁾ C. H. Fiske & Y. Subbarow, J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).

²⁾ W. Mejbaum, Z. physiol. Ch. **258**, 117 (1939).

³⁾ H. G. Albaum & W. W. Umbreit, J. Biol. Chem. **167**, 369 (1947).

⁴⁾ J. D. Smith, & R. Markham, Biochem. J. **46**, 509 (1950).

⁵⁾ E. Chargaff, B. Magasanik, R. Doniger & E. Vischer, Am. Soc. **71**, 1513 (1949).

⁶⁾ R. Markham & J. D. Smith, Biochem. J. **46**, 513 (1950).

Cytidylsäure, das Uridin zwischen Cytidyl- und Uridylsäure. Über die Berechnung der Mischfraktionen siehe unten.

Zur Papierchromatographie wurden die beiden Gemische von *Smith & Markham*¹⁾ verwendet, ersteres mit tertiärem Butylalkohol-Wasser-Salzsäure und letzteres für alkalische Hydrolysate mit Ammoniumsulfatlösung und Isopropylalkohol (genaue Zusammensetzung siehe Seite 512 und 513).

Die Extraktion der Purinbasen erfolgte mit 0,1-n. HCl, diejenige der Purinnukleotide mit 0,1-n. Ammoniak und diejenige der Pyrimidinukleotide mit 0,01-n. HCl. Die Extinktion der Lösungen wurde im *Beckman*-Spektrophotometer, Modell DU, gemessen.

Da sämtliche der untersuchten Filterpapiersorten viel zu grosse Leerwerte, besonders im Gebiete von 270 m μ , ergaben, wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt. Ungefähr zehn 7,2 cm breite und 40 cm lange Streifen von Filterpapier (*Schleicher & Schüll*, Nr. 597) wurden zu einer Walze gerollt und darauf in einer *Soxhlet*-Apparatur 16 Std. mit 15-proz. Ameisensäure, dann 8 Std. mit 96-proz. Alkohol, und schliesslich 16 Std. mit destilliertem Wasser extrahiert. Die Streifen werden durch diese Behandlung etwas brüchig, zeigen jedoch im ganzen untersuchten Spektralbereich einen gleichmässigen, sehr niedrigen Leerwert. Ausserdem lässt sich dieses Papier sehr gut zur Chromatographie phosphathaltiger Substanzen verwenden, da es überhaupt kein Phosphat mehr enthält.

Zur Chromatographie wurden die Filterpapierstreifen in drei gleich breite Streifen unterteilt, die jeweils nur noch oben und unten zusammengehalten wurden. Der mittlere Streifen diente jeweils als Leerwert. Hatte die Flüssigkeitsfront den untern Rand des Streifens erreicht, so wurde dieser herausgenommen, bei 60° getrocknet und in 1 cm breite Stücke geschnitten, welche einzeln extrahiert wurden.

In einzelnen Versuchen wurde die Trennung der Nukleotide an einer Anionenaustauschersäule nach den Angaben von *W. E. Cohn*³⁾ durchgeführt. Zum Auffangen der Fraktionen wurde ein „Technicon“ Time/Flow fraction collector verwendet. (Vgl. Seite 512).

C. Berechnung der Molverhältnisse.

Für die Berechnung der Zusammensetzung der RNS⁴⁾ ist die Kenntnis der Molekularextinktion der einzelnen Bausteine (Nukleotide, Nukleoside und Purinbasen) nötig. Wir

Tabelle 2.

Molekularextinktionen ($\cdot 10^{-3}$) bei verschiedenen Wellenlängen.

m μ	Adenin	Adenylsäure	Guanin	Guanylsäure	Guanylsäure	Uridylsäure	Cytidylsäure
	HCl 0,1-n.	NH ₄ OH 0,1-n.	HCl 0,1-n.	HCl 0,01-n.	NH ₄ OH 0,1-n.	HCl 0,01-n.	HCl 0,01-n.
300		0,03		1,82	0,18		2,38
290	0,05	0,28	4,2	5,68	1,66	0,02	9,25
278				8,47	8,47	4,5	12,9
265		13,32		10,2	11,22		
262	13,3	14,4	7,58			9,9	8,4
255		13,9		12,2	11,14		
250		11,24	11,0	11,16	10,02		4,75
249			11,1				
245	8,05	8,06	10,9	9,18	8,98		
260	13,0	14,7	8,2	11,72	11,34	9,8	6,83

¹⁾ *J. D. Smith & R. Markham*, Biochem. J. **46**, 509 (1950).

²⁾ *R. Markham & J. D. Smith*, Biochem. J. **49**, 401 (1951).

³⁾ *W. E. Cohn*, Am. Soc. **71**, 2275 (1949); **72**, 1471, 2811, 4273 (1950).

⁴⁾ RNS = Ribosenukleinsäure.

haben die Werte teilweise selbst bestimmt, teilweise der Literatur entnommen. Die verwendeten Werte sind in der vorstehenden Tab. zusammengestellt.

Berechnung der Mischfraktionen nach *Kerr, Seraidarian & Wargon*¹⁾. Wie Fig. 2 zeigt, überschneiden sich die einzelnen Fraktionen im Papierchromatogramm um ein wenig. Wir haben für diese Stellen des Chromatogramms, die von *Kerr*¹⁾ angegebene Berechnung verwendet, welche aus der Extinktion bei zwei verschiedenen Wellenlängen den Gehalt der Mischfraktionen an den beiden Komponenten gestattet.

$$c_{\text{Adenin}} = (10,9 \cdot 10^3 \cdot E_{262 \text{ m}\mu} - 7,58 \cdot 10^3 \cdot E_{245 \text{ m}\mu}) / 84,0 \cdot 10^6$$

$$c_{\text{Guanin}} = (13,3 \cdot 10^3 \cdot E_{245 \text{ m}\mu} - 8,05 \cdot 10^3 \cdot E_{262 \text{ m}\mu}) / 84,0 \cdot 10^6$$

$$c_{\text{Cytidylsäure}} = (9,9 \cdot 10^3 \cdot E_{278 \text{ m}\mu} - 4,5 \cdot 10^3 \cdot E_{262 \text{ m}\mu}) / 90,2 \cdot 10^6$$

(Cytidin)

$$c_{\text{Uridylsäure}} = (12,9 \cdot 10^3 \cdot E_{262 \text{ m}\mu} - 8,4 \cdot 10^3 \cdot E_{278 \text{ m}\mu}) / 90,2 \cdot 10^6$$

(Uridin)

Mit Hilfe dieser Formeln wurden 2 Nomogramme berechnet, aus denen das Molverhältnis der Komponenten direkt abgelesen werden konnte und die gleichzeitig die Reinheit der Fraktionen zu ermitteln erlaubten.

Die Methode ist sehr ungenau, da kleine Fehler der Extinktionen sich stark auswirken. In unserm Fall ist die erreichte Genauigkeit genügend, da der Berechnung nur die Bedeutung einer Korrektur zukommt.

Bei den Fraktionen, welche Guanin und Adenin, oder Adenin und Cytidin, oder Cytidylsäure und Uridin enthalten, kann der Anteil der einen Komponente, nämlich Guanin, Cytidin und Cytidylsäure, auch durch Messung der Extinktion bei 290 m μ gefunden werden, weil bei dieser Wellenlänge die Extinktion der andern Komponente (Adenin oder Uridin) vernachlässigt werden kann. (Siehe Tab. 2.)

D. Darstellung von Mitochondrien und Mikrosomen.

Zur Darstellung der Zellfraktionen wurden weisse, männliche Ratten (200–300 g), die vorher 24 Std. auf Hunger gesetzt worden waren, verwendet. Die Tiere wurden durch einen Schlag ins Genick getötet, die Bauchhöhle geöffnet und die Leber vom rechten Vorhof aus mit einer kalten (4°) isotonischen Mannitlösung perfundiert. Das Totalgewicht der Lebern von 15 Tieren betrug 150 g. Die folgenden Zentrifugationen wurden in einer „International“ Kältezentrifuge ausgeführt.

150 g Rattenlebern wurden mit 600 cm³ eines Gemisches von 3 Teilen isotonischem KCl und 2 Teilen 0,2-m. NaF zweimal 1 Min. bei 4° mit einem warring blender (Cuisto) homogenisiert und durch Gaze koliert, dann 30 Min. bei 1300 g (2300 T/Min., Schichthöhe 9–10 cm) zentrifugiert (g = g max.).

Das Überstehende (u_1) wurde auf Mikrosomen weiter verarbeitet (siehe unten).

Die Niederschläge wurden mit isotonischem Mannit auf 600 cm³ aufgefüllt, kurz homogenisiert und 17 Min. bei 1300 g (2500 T/Min., Schichthöhe 6–8 cm) zentrifugiert.

Die erhaltene Mitochondriensuspension wurde vom Sediment (Kerne, Zelltrümmer) dekantiert; sie erwies sich im Phasenmikroskop als rein. Die Suspension (300 cm³) wurde 30 Min. in einer „Sharpless“ bei 38500 g (40000 T/Min.) zentrifugiert. Das Überstehende wurde verworfen. Das Mitochondriensediment wurde im Sharplessrohr auf –30° gefroren und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 12,3 g Trockenpulver, welches etwa 15–20% Mannit enthält.

Mikrosomen. Das Überstehende (u_1) der ersten Zentrifugation wurde 5 Min. in der Sharpless bei 40000 Touren zentrifugiert und der Niederschlag verworfen. Das Überstehende wurde 60 Min. bei 21700 g sedimentiert und das rote, durchsichtige Gel (Mikrosomen) in gefrorenem Zustand getrocknet. Die Ausbeute betrug ungefähr 400 mg.

¹⁾ St. E. Kerr, K. Seraidarian & M. Wargon, J. Biol. Chem. **181**, 761 (1949).

II. Ergebnisse.

A. Aufarbeitung der Mitochondrien.

a) Entfettung und Fraktionierung der Mitochondrien. Da bei unserer Darstellungsmethode die Mitochondrien immer mit Mannit verunreinigt waren, wurde zur Entfettung ein besonderes Verfahren angewendet. Eine abgewogene Menge Mitochondrien, die in gefrorenem Zustand getrocknet worden waren, wurden 14 Std. in einem Mikroextraktionsapparat nach *Hochstrasser* mit Tetrahydro-furan extrahiert. Der Extrakt wurde eingeeengt und 24 Std. bei 4° stehengelassen. Schon während der Extraktion kristallisierte der grösste Teil des Mannits aus; dieser enthält, aus dem Phosphorgehalt zu schliessen, noch etwas Phospholipide. Um den restlichen Mannit zu extrahieren, wurde der Eiweissrückstand im Apparat nach *Hochstrasser* weitere 5 Std. mit Alkohol ausgezogen.

Die Menge des zurückgewonnenen Mannits von der Einwaage abgezogen, ergibt das Gewicht der ursprünglichen Mitochondriensubstanz. Die Analysenresultate beziehen sich alle auf mannitfreie Mitochondrien.

Der Gehalt an RNS wurde durch Extraktion mit heisser Perchlorsäure (Seite 512) oder mit Harnstoff (Seite 513) bestimmt.

Als Restprotein-Phosphor wurde die Differenz des Phosphorgehaltes der entfetteten Mitochondrien abzüglich des Phosphorgehaltes der RNS bezeichnet. Dieser besteht aus der Summe des säurelöslichen Phosphors (siehe c) und des Phosphoprotein-Phosphors.

b) Chemische Zusammensetzung der Mitochondrien. Die Mitochondrien (mit Mannit als Beimischung) enthielten durchschnittlich 10,2% N oder auf mannitfreie Mitochondrien berechnet 12,6% N. Die Tabellenwerte beziehen sich alle auf mannitfreie Mitochondrien.

Über die Zusammensetzung und die P-Verteilung in den Mitochondrien gibt die folgende Tab. Auskunft:

Tabelle 3.
Analyse der Mitochondrien.

Fraktionen	Gew. in mg	Gew. %	‰ P	γ P	P-Verteilung	Pu/Py*)
Mitochondrien roh	415	100	10,24	4230	100	
Mitochondrien entfettet	310	74,7	4,45	1380	32,6	
Gesamtlipide	105	25,3	26,5	2781	65,5	
Phospholipide (P. 25)	69,5	16,75	40,0			
Ribosenukleinsäure	11,8	2,85	92,0	1085	25,6	1,26
Restprotein	298	71,7	1,0	298	7,5	

*) Aus der Bestimmung der Ribose nach *Mejbaum*¹⁾ (vgl. Seite 507) und der Extinktion bei 260 mμ berechnet (siehe Seite 504).

c) Bestimmung des säurelöslichen Phosphors. 100 mg entfettete Mitochondrien wurden 10 Min. in 5 cm³ kalter 8-proz. Trichloressigsäure geschüttelt, dann abzentrifugiert und der Rückstand noch einmal gleich behandelt; dabei wurden 75 γ gesamtsäurelöslicher Phosphor, entsprechend 0,75‰ der entfetteten, oder 0,6‰ der ursprünglichen Mitochondrien erhalten. An anorganischem Phosphor wurden 26 γ, entsprechend 0,26‰ und 0,2‰, bestimmt. Der Trichloressigsäureextrakt zeigte bereits eine positive Pentosereaktion, das heisst, dass schon etwas Ribosenukleinsäure herausgelöst worden war. In der Folge wurde daher auf diese Vorbehandlung der Mitochondrien vor der Nukleinsäureextraktion verzichtet.

¹⁾ *W. Mejbaum*, Z. physiol. Ch. **258**, 117 (1939).

B. Extraktion der Ribosenukleinsäure aus entfetteten Mitochondrien.

Es gelangten folgende Verfahren zur Anwendung:

- a) Extraktion mit 10-proz. Kochsalzlösung (vgl. z. B. *Davidson & Waymouth*¹⁾).
- b) Extraktion mit kalter (4° C) 1-n. Perchlorsäure (*Ogur & Rosen*²⁾).
- c) Extraktion mit heisser Perchlorsäure (1-n. Säure, 30 Min. bei 80°).
- d) Extraktion mit heisser Harnstofflösung (50% G/G, 30 Min. bei 90°).

Zur präparativen Darstellung wurden die Verfahren a, b und d benutzt.

a) Extraktion mit 10-proz. Kochsalzlösung. Aus 300 mg entfetteten Mitochondrien wurden durch insgesamt 4 Auszüge mit 10-proz. Kochsalzlösung 10,3 mg Ribosenukleinsäure (RNS) in Lösung erhalten. Es wurde zweimal mit je 5 cm³ Salzlösung 24 Std. bei 4°, und zweimal mit der gleichen Menge 30 Min. bei 90° extrahiert.

Das Absorptionsspektrum des Extraktes deutet auf die Gegenwart von Riboflavin hin. Aus der Absorption bei 340 m μ wurde ein Gehalt von etwa 0,3 Mikromol Riboflavin pro Gramm entfettete Mitochondrien ermittelt.

Die vereinigten Auszüge wurden dialysiert und die UV.-Absorptionskurve des Dialysates aufgenommen. Sie fiel gleichmässig von 220 m μ bis 300 m μ ab und zeigte nur einen Sattel in der Gegend von 260 m μ . Bestimmungen der Ribose vor und nach der Dialyse ergaben, dass durch die Dialyse 610 γ Ribose verloren gingen. Diese Menge entspricht ungefähr 2,45 mg RNS oder 24% des Gesamtextraktes. Es muss daraus geschlossen werden, dass schon während der Extraktion eine beträchtliche Depolymerisation stattgefunden hat.

Der dialysierte Extrakt wurde hierauf im Vakuum über konz. Schwefelsäure auf ungefähr 1,5 cm³ eingeeengt, dann mit 8 cm³ Alkohol und mit 3 Tropfen azeotroper Salzsäure bis zu pH 3 versetzt. Der zentrifugierte Niederschlag wurde in 0,5 cm³ Wasser und einigen Tropfen 2-n. Ammoniak gelöst, der unlösliche Rückstand filtriert und das Filtrat nach Versetzen mit 5 Tropfen azeotroper Salzsäure 5 Std. stehengelassen. Die Fällung wurde zweimal mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen. Das Präparat (2,5 mg) enthielt noch ca. 30% Eiweiss. Der Eiweissgehalt wurde durch Vergleich mit der Absorption bei 260 m μ ermittelt, wobei $E_{260\text{ m}\mu} = 0,31$ für 10 γ RNS/cm³ angenommen wurde.

Wie aus dieser Ausbeute ersichtlich ist, eignet sich dieses Verfahren nicht besonders zur präparativen Isolierung der RNS, da diese zu stark depolymerisiert wird.

Die Analyse des Präparates ergab das folgende Molverhältnis der Basen:

$$G:A:C:U = 1,41:1,11:1,00:0,51$$

wobei G, A, C und U Guanin, Adenin, Cytidylsäure und Uridylsäure bedeuten.

Ein anderes Präparat, das auf gleiche Weise aus 2 g entfetteten Mitochondrien isoliert worden war, zeigte folgende Zusammensetzung:

$$G:A:C:U = 1,23:1,12:1,00:0,58 \\ 1,28:1,16:1,00:0,55$$

b) Extraktion mit kalter (4° C) 1-n. Perchlorsäure. 8 g entfettete Mitochondrien wurden mit Hilfe eines Vibromischers mit 150 cm³ 1-n. Perchlorsäure über Nacht bei 4° extrahiert. Diese Operation wurde noch dreimal mit je 100 cm³ 1-n. Perchlorsäure während je 24 Std. wiederholt.

Es wurden folgende Fraktionen erhalten: Fraktion I = 37,5 mg; Fraktion II = 203,0 mg; Fraktion III = 41 mg; Fraktion IV = 20 mg, berechnet auf Grund der Extinktion bei 260 m μ . Fraktion III zeigte eine intensive grüngelbe Färbung (Flavine?).

Die vereinigten Extrakte wurden mit dem halben Volumen 0,25-m. Bariumacetat versetzt, dann mit 10-n. Natronlauge neutralisiert. Zu dieser Lösung wurde das 4fache Volumen 96-proz. Alkohol zugegeben. Die entstandene Fällung wurde über Nacht im Kühlraum absitzen gelassen. Darauf wurde der Niederschlag scharf zentrifugiert und nacheinander mit 80-proz., 96-proz. und absolutem Alkohol sowie schliesslich mit absolutem

¹⁾ J. N. Davidson & C. Waymouth, *Biochem. J.* **38**, 39, 375, 379 (1944).

²⁾ M. Ogur & G. Rosen, *Arch. Biochem.* **25**, 262 (1950).

Äther gewaschen. Das Totalgewicht des Niederschlages, der ziemlich viel Carbonat enthielt, betrug 1,4 g (Fraktion Ba-1).

Fraktionierung des Bariumsalzes. 100 mg des erhaltenen Bariumsalzes wurden in der minimalen Menge kalter 0,1-n. Perchlorsäure gelöst und so lange mit 7-proz. Natriumsulfatlösung versetzt bis kein Niederschlag mehr entstand. Die zentrifugierte Lösung wurde bis Kongo-Rot mit 1-n. Natronlauge versetzt und zur Fällung der RNS das vierfache Volumen Alkohol zugegeben. Die zentrifugierte RNS wurde wie vorhin mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Dieses Präparat, welches die höher polymeren Anteile enthält wurde zur alkalischen Hydrolyse verwendet (Fraktion Ba-2).

Die überstehende 80-proz. Alkohollösung (95 cm³) wurde neutralisiert. Nach Zugabe von 2 cm³ 0,25-m. Bariumacetat wurde die Lösung zur vollständigen Fällung der Ba-Salze 24 Std. im Kühlraum stehengelassen (Fraktion Ba-3).

Die Fraktionen Ba-1 und Ba-3 wurden mit 1-n. Salzsäure wie gewohnt hydrolysiert und mit einem Gemisch von tertiärem Butanol und Salzsäure chromatographiert. (Genauere Zusammensetzung des Gemisches siehe Seite 513).

Die Molverhältnisse der Basen waren die folgenden:

Fraktion Ba-1. G:A:C:U = 1,31:0,656:1,00:0,656. Pu/Py = 1,18.

Fraktion Ba-3. G:A:C:U = 0,855:0,590:1,00:0,556. Pu/Py = 0,92.

(Pu = Purine; Py = Pyrimidine.)

Der mit Alkohol und Salzsäure gefällte Teil der RNS (Fraktion Ba-2) wurde einer alkalischen Hydrolyse (24 Std. bei pH 12,5) nach *Chargaff*¹⁾ unterworfen. Für eine saure Hydrolyse reichte das Material nicht aus. Das Hydrolysat wurde mit einem Gemisch von *Markham & Smith*²⁾ chromatographiert. Zusammensetzung des Gemisches: 790 cm³ gesättigte Ammoniumsulfatlösung, 190 cm³ Wasser oder 0,1-m. Puffer pH 6 und 20 cm³ Isopropylalkohol.

G:A:C:U = 1,12:0,915:1,00:0,54

Pu/Py = 1,33

Guanylsäure „b“ = 60% Adenylsäure „b“ = 29%

Guanylsäure „a“ = 40% Adenylsäure „a“ = 71%

Die Purinnukleotide wurden mit 0,1-n. NH₄OH, die Pyrimidinnukleotide mit 0,01-n. HCl aus dem Papierchromatogramm extrahiert.

Alkalische Hydrolyse des Präparates Ba-1 und Chromatographie der Nukleotide an einer Austauschersäule. 71 mg Ba-1 wurden in 0,5 cm³ 0,1-n. Perchlorsäure gelöst. Nach Verdünnung mit 2 cm³ Wasser wurde so lange gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben, bis keine Fällung mehr entstand. Nach Zentrifugation des Niederschlages wurden ⁹/₁₀ des Überstehenden mit einigen Tropfen 10-n. NaOH bis zum Umschlag von Tropäolin O (pH 12,5) versetzt und dann 25 Std. bei 38° stehengelassen. Das Hydrolysat wurde auf 120 cm³ verdünnt und an einer Anionenaustauscherkolonne (Dowex-1) adsorbiert.

Die Kolonne (Dowex-1, 5 cm × 3 cm², Korngrösse Sieb VII PhH. V) wurde vor Gebrauch mit 1-n. HCl und dann mit 1-n. NH₄OH gewaschen, bis die Eluate keine nennenswerte Absorption im UV. mehr zeigten. Nachdem die Kolonne noch mit bidestilliertem Wasser neutral gewaschen war, konnte sie zur Adsorption des Hydrolysates verwendet werden.

Als erstes Elutionsmittel wurde 0,01-n. Ammoniumchlorid (Nukleoside) verwendet. Es wurden praktisch keine Nukleoside erhalten. Elutionsgeschwindigkeit 15 cm³ in 22 Min.

Elution mit 0,001-n. HCl—Cytidylsäure; 0,003-n. HCl—Adenylsäure—Uridylsäure; 0,005-n. HCl—Guanylsäure; 1,0-n. HCl—Rest. Einzelheiten siehe Fig. 3.

Resultate: G:A:C:U = 1,21:0,65:1,00:0,6.

c) Extraktion mit heisser Perchlorsäure (1-n. HClO₄, 30 Min. bei 80°). Dieses Verfahren wurde nur zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an RNS in den entfetteten Mitochondrien verwendet. Eine einmalige Extraktion genügt. Der Gehalt an RNS kam

¹⁾ E. Chargaff, B. Magasanik, R. Doniger & E. Vischer, Am. Soc. **71**, 1513 (1949).

²⁾ R. Markham & J. D. Smith, Biochem. J. **49**, 401 (1951).

aus der Extinktion bei 260 m μ berechnet werden. Zur präparativen Darstellung der RNS kann diese Methode nicht verwendet werden, da die Nukleinsäure teilweise hydrolysiert und ein Teil der Ribose zerstört wird.

d) Extraktion mit heisser Harnstofflösung (50-proz. g/g, 30 Min. bei 90°). 1,45 g entfettete Mitochondrien wurden mit 20 cm³ 50-proz. (g/g) Harnstofflösung 30 Min. extrahiert (Extrakt I) und darauf 30 Min. bei 21000 g zentrifugiert und der Rückstand erneut mit 20 cm³ Harnstofflösung unter den gleichen Bedingungen extrahiert und zentrifugiert (Extrakt II).

Während der Behandlung mit Harnstoff verwandelte sich das Mitochondrienpulver in ein Gel.

Die Extinktionen bei 260 m μ und einer Verdünnung von 1:100 betrugen:

Extrakt I: $E_{260} = 1,15$	Extrakt II: $E_{260} = 0,15$
Extrakt I und II vereinigt	$E_{260\text{m}\mu} = 0,764$

Die vereinigten Extrakte (40 cm³) enthalten daher 98 mg RNS. Unter Voraussetzung eines konstanten Phosphorgehaltes von 9,2% P lässt sich der Nukleinsäure-Phosphor berechnen. Andererseits gibt die Ribosebestimmung nach *Mejbaum*¹⁾ die Purinnukleotide. Aus diesen Zahlen lässt sich der angenäherte Wert für das Verhältnis Purine zu Pyrimidine finden. Für den vorliegenden Extrakt ergab sich ein Wert von Pu/Py = 1,26.

Der Gesamtextrakt wurde über Nacht bei 4° dialysiert (Volumen nach Dialyse 48 cm³) und $E_{260\text{m}\mu}$ bei 80facher Verdünnung bestimmt. Die Extinktion betrug 0,522, was einem Gehalt von 81 mg RNS entspricht. Der Verlust durch Dialyse beträgt demnach 17%.

Der dialysierte Extrakt wurde nun nach *Sevag*²⁾ mit Chloroform-Isobutanol (10:1) bei 4° mittels eines Vibromischers enteiweiss. Zur vollständigen Entfernung des Eiweisses musste diese Operation mehrmals wiederholt werden.

Die RNS wurde nach der Methode (b) als Bariumsalz mit dem vierfachen Volumen Alkohol ausgefällt und mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen.

Einige mg RNS wurden mit 0,2 cm³ 1-n. HCl 1 Std. im kochenden Wasserbad hydrolysiert und die Extinktion bei einer Verdünnung von 1:1000 bei 260 m μ bestimmt: $E_{260\text{m}\mu} = 1,05$ entsprechend einer Menge von 6,76 mg RNS.

Von diesem Hydrolysat wurden Mengen von 10 und 20 mm³ zur Papierchromatographie verwendet. Chromatographiemischung nach *Smith & Markham*³⁾: 700 cm³ tert. Butanol (26°), 132 cm³ azeotrope Salzsäure, mit Wasser auf 1000 cm³ auffüllen. Die Ausbeute aus der Summe der Extinktionen berechnet betrug 98 und 99,5% der aufgetragenen Menge. Resultate in Molverhältnissen ausgedrückt:

G:A:C:U	= 1,36:1,05:1,00:0,55
resp.	= 1,37:1,03:1,00:0,57
Pu:Py	= 1,57 resp. 1,53
C:U	= 1,83 resp. 1,74

Ein anderes auf gleiche Weise erhaltenes Präparat ergab folgende Resultate:

G:A:C:U	= 1,20:0,91:1,00:0,82
	= 1,28:0,96:1,00:0,83
Pu:Py	= 1,15 resp. 1,22

Der Harnstoffextrakt wurde elektrophoretisch (Mikroelektrophoreseapparat von *Antweiler*⁴⁾) untersucht. Es wurden Veronal-Acetat-Puffer nach *Michaelis*⁵⁾ von pH 6,1 und 8,6 verwendet. Es zeigte sich bei beiden pH-Werten eine schnellwandernde Hauptfraktion, deren Menge die anderen Anteile stark übertraf. Es scheint also, dass die Hauptmenge der im Extrakt vorhandenen Nukleinsäure in Form eines Nukleoproteinkomplexes vorliegt.

1) *W. Mejbaum*, Z. physiol. Ch. **258**, 117 (1939).

2) *M. G. Sevag, D. B. Lackman & J. Smolens*, J. Biol. Chem. **124**, 425 (1938).

3) *J. D. Smith & R. Markham*, Biochem. J. **46**, 509 (1950).

4) *H. J. Antweiler*, Koll. Z. **115**, 130 (1949).

5) *L. Michaelis*, Bioch. Z. **234**, 138 (1931).

C. Aufarbeitung der Mikrosomen.

a) Entfettung und Fraktionierung der Mikrosomen (s. Seite 509).

b) Chemische Zusammensetzung der Mikrosomen. Für die Phosphatverteilung wurden praktisch die gleichen Werte wie bei den Mitochondrien gefunden. Der Stickstoffgehalt der Mikrosomen betrug im Durchschnitt 8,8%.

Tabelle 4.

Fraktionen	Gew. in mg	Gew. %	‰ P	γ P	P-Verteilung	Pu/Py*)
Mikrosomen roh . .	172,4	100	16,1	2780	100	1,26
Mikrosomen entfettet	101,0	58,5	9,2	930	33,5	
Gesamtlipide . . .	71	41,5	26,2	1860	67,0	
Phospholipide (P. 25)	46,5	27,0	40,0			
Nukleinsäure . . .	7,95	4,6	92,0	730	26,4	
Restprotein	93,0	54,0	2,1	195	7,0	

*) Aus der Bestimmung der Ribose nach *Mejbaum* (vgl. Seite 507) und der Extinktion bei 260 m μ berechnet (S. 504).

c) Extraktion und Analyse der Ribosenukleinsäure. Wegen des spärlichen Ausgangsmaterials wurde nur die Extraktionsmethode mit kalter Perchlorsäure verwendet. Die Resultate der Bausteinanalyse sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Tabelle 5.

Mitochondrien.

G = Guanin A = Adenin C = Cytidylsäure U = Uridylsäure Pu = Purine
Py = Pyrimidine.

Präparat	Pu/Py	G	A	C	U	G A	A U	G U
HClO ₄ -Extrakte Ba-1 . .	1,18	1,31	0,656	1	0,656	2,01	1,0	1,99
HClO ₄ -Extrakte Ba-2 . .	1,33	1,12	0,915	1	0,54	1,22	1,72	2,08
HClO ₄ -Extrakte Ba-3 . .	0,92	0,855	0,59	1	0,556	1,45	1,05	1,54
Ba-1 an Dowex-1	1,15	1,21	0,65	1	0,60	1,87	1,08	2,02
NaCl-Extrakte	1,5	1,24	1,125	1	0,57	1,1	1,97	2,18
	1,57	1,28	1,16	1	0,55	1,11	2,1	2,32
Harnstoffextrakte	1,57	1,36	1,05	1	0,545	1,3	1,92	2,49
I	1,53	1,37	1,03	1	0,574	1,34	1,8	2,39
Harnstoffextrakte	1,15	1,20	0,91	1	0,823	1,32	1,1	1,46
II	1,22	1,28	0,96	1	0,83	1,33	1,2	1,54

Mikrosomen.

Präparat	Pu/Py	G	A	C	U	G/A	A U	G U
HClO ₄ -Ba-Extrakte . . .	0,98	1,11	0,51	1	0,662	2,19	0,77	1,68
	0,99	1,16	0,575	1	0,75	2,03	0,77	1,56
HClO ₄ -Ba-Extrakte . . .	1,13	1,28	0,614	1	0,675	2,08	0,91	1,89
	1,12	1,33	0,63	1	0,75	2,12	0,84	1,78

II. Teil: Untersuchungen über den Lipidanteil der Lebermitochondrien.

Bekanntlich sind die Mitochondrien, wie bereits in der Einleitung vom I. Teil erwähnt wurde, sehr reich an Lipiden (etwa 25 % des Trockengewichtes). *Swanson & Artom*¹⁾ fanden bei der Analyse von Rattenlebermitochondrien folgende Lipidfraktionen: Gesamtfettsäuren 61,7 %; Neutralfettsäuren 13 %; Gesamtcholesterin 4,4 %, wovon 2,4 % in freier Form; Gesamtphospholipide 78,7 %; Lecithin 45 %; Sphingomyelin 8 %; Phospholipide, die kein Cholin enthalten, 43 %, wovon 23 % Phosphatidyl-äthanolamin.

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob in den Mitochondrien eventuell auch Wirkstoffe aus der Gruppe der Sterine vorkommen. Die Leber ist eines der wichtigsten Erfolgsorgane der Nebennierenrindenhormone. Es wäre daher durchaus denkbar, dass sich solche Hormone oder deren Abbauprodukte in den Lipiden der Leber nachweisen lassen. Wir haben deshalb einige orientierende Versuche in dieser Richtung ausgeführt.

Es sind in der letzten Zeit leistungsfähige Methoden zur papierchromatographischen Trennung der Rindensteroiden entwickelt worden (*Zaffaroni et al.*²⁾³⁾⁴⁾).

Für den Nachweis der Steroide auf dem Papierchromatogramm sind verschiedene Reagenzien vorgeschlagen worden. Für reduzierende Corticosteroide: Ammoniakalische Lösungen von Silbernitrat (*Zaffaroni*²⁾), oder Triphenyltetrazoliumchlorid (*Zaffaroni*⁴⁾, *Bassil & Boscott*⁵⁾ und *Hofmann & Staudinger*⁶⁾). Für α , β -ungesättigte Ketone wird die Absorption im UV. bei 230–240 m μ gemessen oder das Chromatogramm mit Osmiumtetroxyd entwickelt (*Morato Manaro & Zygmontowicz*⁷⁾).

Weitere Steroidreaktionen: Erhitzen mit verdünnter Phosphorsäure (*Neher & Wettstein*⁸⁾), mit Antimontrichlorid in Chloroform (*Neher & Wettstein*⁸⁾, *Levine & Richman*⁹⁾, *Pincus*¹⁰⁾), mit Dinitrophenylhydrazin in salzsaurem Methanol (*Bassil & Boscott*⁵⁾), mit Anisaldehyd-Eisessig-Schwefelsäure (*Miescher*¹¹⁾, *Neher & Wettstein*⁸⁾). Ausserdem können die extrahierten Steroide 2 Std. mit konzentrierter Schwefelsäure stehengelassen und dann die charakteristischen Spektren aufgenommen werden (*Zaffaroni*¹²⁾).

Für Cortison (compound E) scheint eine Blaufärbung nach Entwicklung mit Jodjodkalium ziemlich spezifisch zu sein (*Zaffaroni et al.*²⁾⁴⁾, *Bassil & Boscott*⁵⁾). Um eine erste Übersicht über die Natur der vorhandenen Sterine zu erhalten, ist die Methode von *Neher & Wettstein*⁸⁾, bei welcher die verschiedenen Rindenhormone zum Teil typische Fluoreszenzfarben im UV. zeigen, besonders gut brauchbar.

¹⁾ *M. A. Swanson & C. Artom*, J. Biol. Chem. **187**, 281 (1951).

²⁾ *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann*, Science **111**, 6 (1950).

³⁾ *R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann*, J. Biol. Chem. **177**, 109 (1949).

⁴⁾ *R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann*, J. Biol. Chem. **188**, 763 (1951).

⁵⁾ *G. T. Bassil & R. J. Boscott*, Biochem. J. **48**, XLVIII (1951).

⁶⁾ *H. Hofmann & H. Staudinger*, Naturwiss. **38**, 213 (1951).

⁷⁾ *J. Morato Manaro & A. Zygmontowicz*, Endocrinology **48**, 114 (1951).

⁸⁾ *R. Neher & A. Wettstein*, Helv. **34**, 2278 (1951).

⁹⁾ *V. E. Levine & E. Richman*, J. Biol. Chem. **101**, 373 (1933).

¹⁰⁾ *G. Pincus*, Endocrinology **32**, 176 (1943).

¹¹⁾ *K. Miescher*, Helv. **29**, 743 (1946).

¹²⁾ *A. Zaffaroni*, Am. Soc. **72**, 3828 (1950).

Wir haben die aus den Mitochondrien gewonnenen Lipide (nach Entfernung der Phosphatide) mit Wasser extrahiert. Die chromatographische Analyse des Extraktes nach den genannten Methoden deutet auf die Gegenwart von Sterinen hin. Wahrscheinlich handelt es sich um Umwandlungsprodukte der Rindenhormone, die in den Lipiden der Leber angereichert sind. Da über die Sterine der Mitochondrien bisher nichts bekannt ist, möchten wir unsere vorläufigen Resultate ahangsweise mitteilen; die Versuche werden fortgesetzt.

Die Untersuchungen wurden an Lebermitochondrien von Ratte, Kaninchen und Schwein mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Experimentelles.

Die Mitochondrien wurden nach der üblichen Methode hergestellt und dann in Portionen von 5—6 g 4 Std. im Extraktionsapparat nach *Hochstrasser* mit Tetrahydro-furan extrahiert. Nach Verdampfen des Tetrahydro-furans im Vakuum wurde der Lipidrückstand 2 Std. unter Rückfluss mit Aceton erwärmt. Die Lösung wurde dann noch 2 Std. bei 40° zur vollständigen Sedimentation der Phosphatide stengelassen. Die Phosphatide wurden zentrifugiert und mit 10 cm³ Aceton nachgewaschen. Die vereinigten Acetonextrakte wurden nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum 24 Std. mit 10 cm³ Wasser bei 38° stengelassen. Die entstandene Emulsion wurde durch Zugabe von drei Tropfen 0,25-m. Bariumacetat geschieden. Nach dem Zentrifugieren des Niederschlages wurde das Überstehende im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand in 1 cm³ Aceton aufgenommen. Diese Acetonlösung wurde dann in Mengen von 10—50 mm³ zur papierchromatographischen Analyse mit Toluol-Propylenglykol verwendet (*Zaffaroni*)¹⁾²⁾.

Papierchromatographie. Die Chromatogramme wurden 3—4 Std. mit Propylenglykol-Toluol absteigend entwickelt. Als Kontrollsubstanzen wurden comp. F nach *Kendall* und Substanz S nach *Reichstein* verwendet (Papier *Schleicher & Schüll* Nr. 597. extrahiert).

Absorption im UV. (siehe Fig. 4A). Die stärkste Absorption wurde bei den nicht mitgeführten Substanzen (I) festgestellt. Dicht darunter war noch ein schwächerer Fleck (II) sichtbar, dessen Rf-Wert aber immer noch kleiner als derjenige von comp. F war.

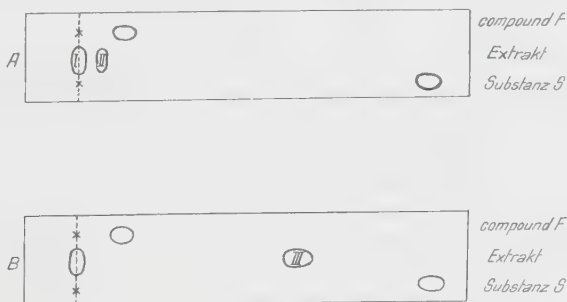


Fig. 4.

Papierchromatogramme des Lipidextraktes mit Toluol-Propylenglykol 4 Std. absteigend entwickelt.

A = Absorption im UV. B = Bild im UV, nach Entwicklung mit 15-proz. Phosphorsäure.

¹⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, *Science* **111**, 6 (1950).

²⁾ R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).

Entwicklung mit 15-proz. Phosphorsäure¹⁾ (siehe Fig. 4B). Bei dieser Entwicklungsmethode trat ein intensiv gelbfluoreszierender Fleck (III) auf, dessen Rf-Wert in der Mitte der Werte der Kontrollsubstanzen lag. Substanz II liess sich auf diese Art nicht nachweisen. Substanz I und III ergaben im Sichtbaren eine Braunfärbung. Ausser den drei beschriebenen Flecken war noch ein vierter vorhanden, der fast mit der Front wanderte und mit dieser Reaktion eine gelbgrüne Fluoreszenz zeigte.

Substanz III muss, nach der Intensität der Fluoreszenz zu urteilen, in beträchtlicher Menge vorliegen. Nach Säurehydrolyse (*Bachman & Pettit*²⁾) bleibt Substanz III unverändert. Es kann sich also nicht um ein konjugiertes Sterin handeln.

Hydrolyse. Im speziellen Fall wurde 1 Std. mit 1-n. HCl in zugeschmolzenem Glasrohr, unter Stickstoffatmosphäre, in kochendem Wasserbad hydrolysiert.

Alkalische Silberdiamminlösung³⁾. Substanz I reduziert sehr intensiv und rasch (1–2 Min.) bei Zimmertemperatur, Substanz III dagegen erst nach 30 Min. und viel schwächer. Substanz II reduziert nicht.

Anisaldehyd-Eisessig-Schwefelsäure¹⁾⁴⁾. Substanz I ergab im sichtbaren Licht eine rotbraune Färbung, Substanz II eine violette (im UV. rotorange), Substanz III eine schmutzige graugrüne bis blaviolette (im UV. rotorange) Färbung.

Antimontrichlorid in Chloroform¹⁾. Substanz I erzeugt eine schwarzbraune, Substanz III eine braunviolette (im UV. rotorange) Färbung. Substanz II reagiert nicht.

Dinitrophenylhydrazin-Salzsäure-Methanol⁵⁾. Substanz I und III reagieren schon bei Zimmertemperatur. Bei Substanz II fällt die Reaktion negativ aus.

Jodjodkalium und Wasserstoffsuperoxyd⁵⁾. Substanz I ergibt eine Blaufärbung, die andern Substanzen reagieren nicht.

Reaktion mit Osmiumtetroxyd⁶⁾. Diese Reaktion fiel nach 48 Std. für Substanz I und II positiv aus. Substanz III reagierte nicht.

Extraktion der Substanzen und Reaktion mit konz. Schwefelsäure⁷⁾. Die substanzhaltigen Stellen des Chromatogramms wurden ausgeschnitten und 6 Std. bei 38° mit Wasser extrahiert. Die wässrige Lösung wurde dann im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand zuerst 2 Std. unter Zusatz von 4 cm³ konzentrierter Schwefelsäure stehengelassen. Das Spektrum zeigte für Substanz I und III ein Maximum bei 290 m μ , während Substanz II kein deutliches Maximum aufwies. Nach 20 Std. Farbentwicklung zeigten alle drei Substanzen nur noch ein deutliches Maximum in der Gegend von 265–270 m μ .

Da Substanz III bei 239 m μ keine nennenswerte Absorption mehr besitzt und ausserdem die Reaktion mit Osmiumtetroxyd negativ ausfällt, scheint die α,β -ungesättigte Ketogruppe, die bei allen wirksamen Corticosteroiden vorhanden ist, im Ring A zu fehlen. Es liegt wahrscheinlich ein Pregnan-, oder allo-Pregnanderivat mit einer Oxygruppe in Stellung 3 vor. Vor kurzem erschien eine Arbeit von *Schneider*⁸⁾, in der die Umwandlung des Desoxycorticosterons zu vier isomeren Allo-pregnanderivaten mit Hilfe von Leberschnitten beschrieben wird.

¹⁾ R. Neher & A. Wettstein, *Helv.* **34**, 2278 (1951).

²⁾ C. Bachman & D. S. Pettit, *J. Biol. Chem.* **138**, 689 (1941).

³⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, *Science* **111**, 6 (1950).

⁴⁾ K. Miescher, *Helv.* **29**, 743 (1946).

⁵⁾ G. T. Bassil & R. J. Boscott, *Biochem. J.* **48**, XLVIII, (1951).

⁶⁾ J. Morato Manaro & A. Zygmontowicz, *Endocrinology* **48**, 114 (1951).

⁷⁾ A. Zaffaroni, *Am. Soc.* **72**, 3828 (1950).

⁸⁾ J. J. Schneider, *J. Biol. Chem.* **199**, 235 (1952).

Sofern die gelbe Fluoreszenz nach Behandlung mit Phosphorsäure als genügend spezifisch betrachtet werden kann, so ist in Stellung 11 eine Hydroxylgruppe vorhanden.

Da Substanz III einerseits ein Dinitrophenylhydrazon bildet, anderseits ammoniakalische Silbernitratlösung reduziert, so ist offenbar an C-17 die α -Ketolseitenkette der biologisch aktiven Rindenhormone noch vorhanden. Es lässt sich auf Grund der qualitativen Reaktionen nicht entscheiden, ob C-17 eine OH-Gruppe trägt. Es kommen so als mögliche Steroide die Substanzen V und C (*Reichstein*) in Frage, oder eventuell sauerstoffärmere Derivate, da die OH-Gruppen in Stellung 11 und 17 nicht bewiesen werden konnten.

Zu Vergleichszwecken wurden noch folgende Substanzen chromatographiert: Östradiol, Androsteron, Pregnandiol, Progesteron, Testosteron, Δ^4 -Androsten-3,17-dion, Östron, comp. E und F (*Kendall*), Substanz S (*Reichstein*), Desoxycorticosteron, Δ^4 -Pregnen-11,17 β ,20,21-tetrol-3-on, Adrenosteron, allo-Pregnan-3,11,17,20,21-pentol, Δ^4 -Pregnen-11,17 β ,20,21-tetrol-3-on.

Wir danken Prof. *T. Reichstein*, Basel, und Dr. *A. Wettstein* (*Ciba*), Basel, für die freundliche Überlassung verschiedener Sterine.

SUMMARY.

1. Ribonucleic acid has been extracted from isolated rat liver mitochondria by different methods (extraction carried out in perchloric acid, 10% sodium chloride or concentrated urea solution). The ratio of the bases was determined by chromatographic analysis after acid or alkaline hydrolysis of the nucleic acids. It is shown that the composition of the samples varies with the mode of extraction. Perchloric acid extracts furnished samples similar in composition to those found by other authors using whole liver ribonucleic acids. The preparations obtained with sodium chloride or urea solution showed a greater content of adenine and uracil. The significance of these results is discussed.

2. The steroids present in the lipid fraction of rat, rabbit and pig liver mitochondria have been detected by paper chromatography. The amounts present were too small for isolation. We have characterized the steroids by different colour reactions. It appears that the compounds are pregnane or allopregnan derivatives similar to those obtained by biological reduction of cortical steroids by rat liver slices.

Über den Einfluss des Methylenblaus auf die Atmung der Lebermitochondrien

Die biologische Citrullinsynthese in den Lebermitochondrien wird durch den basischen Vitalfarbstoff Janusgrün (Diazingrün) gehemmt¹⁾. Wird die Aktivität gegen den Logarithmus der Farbstoffkonzentration aufgetragen, so ergibt sich eine leicht S-förmig gekrümmte Kurve, deren Form an eine Dissoziationskurve erinnert. Bei Sättigung der Mitochondrien mit dem Farbstoff, kenntlich an der Färbung der überstehenden Lösung nach Fällung der Suspension mit Trichloressigsäure, ist auch die Aktivität auf Null gesunken. Es scheint also, dass die Hemmung der Fermentaktivität, in diesem besonderen Fall der Citrullinsynthese, der Bindung des Farbstoffs an die Mitochondrien parallel geht und möglicherweise mit ihr in direktem Zusammenhang steht. Es stellt sich die Frage, ob das Janusgrün, das von den Cytologen zur spezifischen Anfärbung der Mitochondrien verwendet wird, eine spezielle Reaktion der Citrullinsynthese hemmt, oder ob es in den allgemeinen Stoffwechselprozess eingreift. Wir haben daher den Einfluss des Janusgrüns auf die Atmung der isolierten Granula (in einigen Versuchen auch auf die Succinoxidase) untersucht und gleichzeitig noch andere Farbstoffe in die Untersuchung einbezogen. Dabei hat sich gezeigt, dass bei genügend hoher Konzentration alle untersuchten Farbstoffe eine ähnliche Hemmwirkung wie Janusgrün zeigen. Verschiedene Farbstoffe, am ausgesprochensten das Methylenblau, können aber unter bestimmten Bedingungen die Atmung der Mitochondrien beträchtlich steigern. Wir berichten im folgenden über diese Versuche.

Fig. 1 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Succinoxidase für verschiedene Farbstoffe (Janusgrün, Toluidinblau, Pyronin) bei einer Versuchsdauer von 30 Min. Bei genügend hoher Konzentration ist die Hemmung vollständig. Die Konzentration für 50-proz. Hemmung liegt bei ca. 10^{-5} Mol/l. Der zeitliche Verlauf der Sauerstoffaufnahme zeigt aber, dass es sich nicht einfach um eine Bindung des Farbstoffes an gewisse Elemente der Mitochondrien handeln kann, sondern dass ein viel komplexeres Phänomen vorliegt. Es zeigt sich nämlich, dass in den meisten Fällen die Hemmwirkung des Farbstoffes erst allmählich einsetzt. Zu Beginn, während den ersten 10–20 Min. des Versuches, ist die Atmung bei mittleren Farb-

¹⁾ F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper. **4**, 278 (1948).

stoffkonzentrationen (ca. 10^{-5} -m.) nur wenig herabgesetzt, oder sie ist sogar gegenüber der Kontrolle beträchtlich erhöht. Dieser letzte Effekt ist besonders ausgesprochen beim Methylenblau. Die Steigerung kann hier über 100 % betragen (vgl. Fig. 2 und 3). Die einzelnen Mitochondriensuspensionen zeigen beträchtliche individuelle Unterschiede in ihrem Verhalten gegenüber dem Farbstoff. Die Aktivierung der Atmung durch Methylenblau lässt sich nicht immer reproduzieren. Wir werden auf diese Frage zurückkommen.

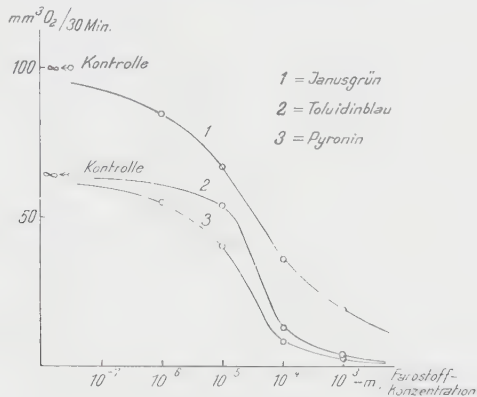


Fig. 1.

Hemmung der Succinoxidase durch Farbstoffe.

Als Fermentpräparat diente eine vierfach verdünnte Mitochondriensuspension (Leuthardt & Müller¹) in isotonischem Mannit. Milieu von Schneider & Potter²). Der Farbstoff wurde erst nach 10 Minuten aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.

Die Analyse des Vorganges zeigt, dass sich offenbar zwei verschiedene Effekte des Farbstoffes überlagern, eine steigernde Wirkung, die sofort einsetzt, und eine Hemmung, die sich erst allmählich entwickelt. Die Steigerung der Atmung durch Farbstoffe ist keine vereinzelte Erscheinung. Barron & Harrop³) haben 1928 beobachtet, dass Methylenblau die sehr geringe Atmung von Kaninchenerythrocyten in glucoselhaltiger Lösung auf das 20fache steigert. Der Vorgang ist später von Warburg⁴) genauer untersucht worden und hat schliesslich zur Entdeckung der wasserstoffübertragenden Fermente geführt. Auch an kernhaltigen Zellen lässt sich der Methylenblau-effekt beobachten, so an Vogelerythrocyten (Warburg⁴)) oder wie Barron & Hoffmann⁵) nachgewiesen haben, an den Eiern von Seesternen. Die letzt-

¹) F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper. **4**, 278 (1948).

²) W. C. Schneider & V. R. Potter, J. Biol. Chem. **149**, 217 (1943); ferner cit. in W. W. Umbreit, „Manometric techniques and related methods“, Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1946, S. 95.

³) E. S. G. Barron & G. A. Harrop, J. Biol. Chem. **79**, 65 (1928).

⁴) O. Warburg, „Wasserstoffübertragende Fermente“, Cantor GmbH., Freiburg i. Br. 1949.

⁵) E. S. G. Barron & L. A. Hoffmann, J. Gen. Physiol. **13**, 483 (1930).

genannten Autoren haben eine Reihe von Farbstoffen untersucht und dabei festgestellt, dass ihr Einfluss auf die Atmung deutlich vom Redoxpotential abhängig ist. Toluylenblau ($E_0 = +0,115$ Volt), Methylenblau ($E_0 = +0,011$ Volt) und Cresylblau ($E_0 = 0,035$ Volt; alle Potentiale bei pH 7,0) zeigten die stärkste Wirkung (Steigerung gegen 300 % der Kontrolle ohne Farbstoff). Bei Farbstoffen mit negativerem oder positiverem Redoxpotential als die obgenannten, ist die Wirkung bedeutend geringer. Die Erklärung für die Methylenblauwirkung liegt darin, dass Methylenblau die Oxydation der gelben Fermente durch Sauerstoff katalysiert (Warburg¹):

Methylenblau + Leukoferment = Leukomethylenblau + gelbes Ferment

Leukomethylenblau + Sauerstoff = Methylenblau



Fig. 2.

Wirkung des Methylenblaus auf die Pyruvatoxydation.

Milieu nach *Leuthardt & Mauron*². Endkonzentration des Farbstoffes 10^{-5} m.

1. Kontrolle ohne Farbstoff, mit Substrat ($8,35 \cdot 10^{-3}$ m. Pyruvat).
2. Kontrolle ohne Farbstoff ohne Substrat.
3. Substrat + Farbstoff im Hauptraum von Anfang an zusammen.
4. Substrat + Farbstoff nach 15 Min. aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.
5. Leerwert ohne Substrat mit Farbstoff.



Fig. 3.

Methylenblauwirkung.

Milieu nach *Leuthardt & Mauron*². Substrat I ($8,35 \cdot 10^{-3}$ m. Pyruvat), Substrat II ($8,35 \cdot 10^{-3}$ m. Pyruvat + $8,35 \cdot 10^{-4}$ m. Succinat). Endkonzentration des Methylenblaus 10^{-5} m.

1. Kontrolle mit Substrat I.
2. Kontrolle mit Substrat II.
3. Farbstoff + Substrat I nach 15 Min. aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.
4. Farbstoff + Substrat II nach 15 Min. aus dem Anhang zum Milieu zugekippt.

¹) O. Warburg, „Wasserstoffübertragende Fermente“. Cantor GmbH., Freiburg i.Br. 1949.

²) F. Leuthardt & J. Mauron, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **8**, 386 (1950).

An unserem Institut hat *Stachelin*¹⁾ versucht, diesen Mechanismus in den Mitochondrien dadurch direkt nachzuweisen, dass er die eisenhaltigen Fermente durch HCN blockierte; durch Zusatz von Methylenblau würde dann ein Nebenweg geöffnet und die Sauerstoffaufnahme teilweise wieder in Gang gebracht. Diese Versuchsanordnung führte bei den Mitochondrien nicht zum Ziel, weil dieselben keinen Eingriff in ihr Respirationssystem ertragen. Jede Hemmung des Stoffwechsels führt zur Quellung der Mitochondrien und schliesslich zu deren vollständigen Zerstörung. Wahrscheinlich hängt bei keinen bisher untersuchten Gebilden die morphologische Integrität so eng mit dem Stoffwechsel zusammen, wie bei den Mitochondrien. *Raaflaub*⁵⁾ hat dieses Problem eingehend untersucht.

Die zweite Wirkung des Farbstoffes, nämlich die Hemmung der Atmung, ist wahrscheinlich komplexer Natur. Die eben erwähnten Untersuchungen von *Raaflaub*²⁾ haben ergeben, dass die Mitochondrien bei Abwesenheit eines Substrats, das sie veratmen können, ihre Aktivität rasch verlieren. Diese Inaktivierung erfolgt bei Gegenwart von Methylenblau noch bedeutend rascher. Die Versuche wurden in *Warburg*-Manometern durchgeführt, wobei der Farbstoff entweder zu Beginn dem Hauptraum zugesetzt oder nachträglich aus dem Anhang eingekippt wurde. Ein typischer Versuch mit Pyruvat als Atmungssubstrat ist in Fig. 2 dargestellt. Im Kontrollversuch (Substrat von Anfang an zugesetzt) verläuft die Sauerstoffaufnahme während der ganzen Versuchsdauer linear. Wird das Methylenblau mit dem Pyruvat zusammen in den Anhang gegeben und nachträglich gekippt (15 Min. nach Versuchsbeginn), so nimmt die Sauerstoffaufnahme schon nach wenigen Min. stark ab, während bei nachträglicher Zugabe von Pyruvat allein (in Fig. 2 nicht dargestellt) nach dieser Zeit kaum eine Veränderung der Aktivität festzustellen ist. Wird Methylenblau zu Beginn ohne Substrat zugesetzt, so findet bei nachträglichem Einkippen des Substrats (nach 15 Min.) keine wesentliche Oxydation mehr statt; die Mitochondrien sind während der kurzen Zeit des Kontakts mit dem Farbstoff, bei Abwesenheit eines Atmungssubstrates, völlig inaktiviert worden.

Die Veratmung des Pyruvats durch die Lebermitochondrien wird im allgemeinen durch Zusatz von Succinat oder Fumarat nicht beschleunigt, wie dies im Muskel der Fall ist (*Leuthardt & Mauron*³⁾). Diese Tatsache wird durch die beiden mittleren Kurven in Fig. 3 illustriert. Wahrscheinlich enthalten die intakten Granula genügend Dicarbonsäuren, um den Citronensäurecyklus in Gang zu bringen. Wird dagegen Methylenblau zugesetzt, so hat das Succinat einen sehr

1) *F. Leuthardt & M. Stachelin*, unveröffentlichte Versuche.

2) *J. Raaflaub*. Résumés des Communications du IIe Congrès International de Biochimie, Paris, Juli 1952, S. 41; wird in *Helv. physiol. pharmacol. acta* **11** (1953) erscheinen.

3) *F. Leuthardt & J. Mauron*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **8**, 386 (1950).

starken Einfluss. Fig. 3 zeigt einen derartigen Versuch. Substrat und Farbstoff befanden sich hier im Anhang und wurden gleichzeitig eingekippt. Ohne Succinat bewirkt das Methylenblau schon während der zweiten 10-Minuten-Periode eine starke Abnahme der Atmung. Die Sauerstoffaufnahme ist nach 1 Std. auf den Wert von etwa $3 \text{ mm}^3 \text{ O}_2$ pro 10 Min. abgesunken (Kontrollwert $35 \text{ mm}^3/10 \text{ Min.}$). Bei Gegenwart von Succinat ruft dagegen Methylenblau eine starke Steigerung der Atmung hervor (94 mm^3 während der ersten 10-Minuten-Periode): die Sauerstoffaufnahme beginnt erst nach etwa 40 Min. deutlich abzusinken, d. h. der Eintritt der Hemmwirkung wird durch die Dicarbonsäure stark verzögert. Dieser Effekt des Succinats, wenn auch weniger ausgesprochen, tritt auch in Erscheinung, wenn der Farbstoff dem Hauptraum zugesetzt und das Substrat erst nachträglich zugekippt wird. Die gleiche Wirkung wie Succinat haben auch Citrat, Fumarat und α -Ketoglutarat. Wir verzichten darauf, diese Versuche durch Kurven zu illustrieren. Für die auffallende Wirkung der Dicarbonsäuren in Gegenwart des Methylenblaus lässt sich zur Zeit keine sichere Erklärung geben. Möglicherweise schädigt der Farbstoff die Mitochondrien derart, dass ihre Grenzschicht durchlässiger wird und die im Innern enthaltenen Dicarbonsäuren, eventuell auch gewisse Kofaktoren, in das Milieu entweichen lässt. Zusatz von Succinat, α -Ketoglutarat oder Citrat würde erneut den Ablauf des Citronensäurezyklus gestatten. Gleichzeitig wird damit die erhöhte Permeabilität das Eindringen des Farbstoffes und seine Reaktion mit den Fermentsystemen der Granula erleichtern.

Über die Natur der Methylenblauwirkung auf die Mitochondrien lassen sich nur Vermutungen äussern. Wir haben oben bereits erwähnt, dass jede Unterbrechung ihres oxydativen Stoffwechsels zur Zerstörung ihrer Struktur führt. Besonders wichtig für die Erhaltung ihrer Struktur scheint das Adenosintriphosphat zu sein. Man kann als Indikator für die Schädigung der Mitochondrien, wie *Raaflaub*¹⁾ gezeigt hat, ihre Quellung benützen. Durch Zusatz von ATP lässt sich auch bei Abwesenheit von Atmungssubstraten die Quellung während längerer Zeit verhindern (*Raaflaub*¹⁾). Alle Agentien, welche die Resynthese des ATP hemmen, werden daher auch zu einer Quellung und Desintegration der Granula führen. In reinem Sauerstoff verlieren die Mitochondrien ihre Aktivität rascher als in der Luft. Offenbar sind an ihrer Inaktivierung oxydative Vorgänge beteiligt, z. B. Oxydation von reaktiven Sulfhydrylgruppen in SH-Fermenten. Möglicherweise beruht die Wirkung der Redoxfarbstoffe z. T. darin, dass sie die Oxydation derartiger Gruppen katalytisch beschleunigen.

Für die Stabilität der Lebermitochondrien, und damit auch für ihr Verhalten gegen Farbstoffe, spielt ihr Gehalt an Substraten und Kofaktoren eine wesentliche Rolle. Wir

¹⁾ *J. Raaflaub*, *Résumés des Communications du IIe Congrès International de Biochimie*, Paris, Juli 1952, S. 41; wird in *Helv. physiol. pharmacol. acta* **11** (1953) erscheinen.

haben immer wieder beobachtet, dass die aus Lebern von gut gefütterten Tieren, besonders im Zustand der Verdauung gewonnenen Granula, gegen Schädigungen aller Art weniger empfindlich sind, als solche aus den Lebern fastender Tiere. Es ist daher auch verständlich, dass, wie wir oben erwähnt haben, die Grösse der beschriebenen Effekte auch bei anscheinend gleichen Bedingungen, nicht streng reproduzierbar ist. Um möglichst günstige Bedingungen herzustellen, haben wir unsere Versuchstiere mit einem Gemisch von B-Faktoren vorbehandelt, können aber nicht sicher angeben, ob dadurch tatsächlich ein geeignetes Versuchsmaterial erhalten werden kann, da wir keinen systematischen Vergleich zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren angestellt haben.

Ähnliche Versuche wurden auch mit anderen Farbstoffen durchgeführt. Auch beim Janusgrün ist bei Gegenwart von Dicarbonsäuren eine leichte, atmungssteigernde Wirkung vorhanden. Sie erreicht aber bei einer Farbstoffkonzentration von 10^{-5} -m. nur etwa 20% gegenüber der Kontrolle (Redoxpotential von Janusgrün = -0,257 Volt, vgl. *Barron & Hoffmann*¹⁾). Etwas anderer Art scheint die Wirkung des Pyronins und Triphenyltetrazoliumchlorids zu sein. Hier zeigt sich keine Andeutung einer Atmungssteigerung. Während den ersten beiden 10-Minuten-Perioden ist im Gegenteil die Sauerstoffaufnahme eher kleiner als später. (Bei 10^{-5} -m. Farbstoffkonzentration und Pyruvat als Substrat, z. B. 11 mm³ von 0–10 Min., 20 mm³ von 50–60 Min. Entsprechende Werte für die Kontrolle ohne Pyronin: 25 mm³ und 36 mm³.) Pyronin kann sich mit Nukleinsäuren verbinden und wird daher in der Cytologie zur Färbung der Nukleinsäure enthaltenden Strukturen benützt. Man könnte also hier an eine Blockierung nukleinsäurehaltiger Strukturen durch den Farbstoff denken. Es ist völlig unbekannt, ob durch eine Bindung des Farbstoffs an die sauren Gruppen der Ribosenukleinsäure, die Fermentaktivität der Mitochondrien gehemmt werden kann. Die Hemmung der Succinoxidase durch Ribonuklease (*Potter & Albaum*²⁾, *Zittle*³⁾) kann hier nicht zum Vergleich herangezogen werden. Die Hemmung braucht hier nicht durch eine direkte Folge des Abbaues der Nukleinsäure zustande zu kommen, sondern könnte auch durch die Bildung stark hemmender Abbauprodukte erklärt werden. Nach *Schneider*⁴⁾ ist überhaupt die Hemmung der Succinoxidase durch eine Verunreinigung der Ribonukleasepräparate bedingt.

Experimenteller Teil.

Chemikalien. Methylenblauchlorid: *J. D. Riedel-de Haën*; Janusgrün B: *Farbwerke Hoechst*; Triphenyltetrazoliumchlorid: *Bayer*, Leverkusen; Pyronin, Base: *CIBA*, Basel.

Tiermaterial. Weisse, weibliche Ratten (eigene Zucht), die ausschliesslich Fleisch als Futter erhielten, wurden jeweils 24 Std. vor Versuchsbeginn auf Hunger gesetzt. Das Gewicht der Tiere betrug im Durchschnitt 270 g. Für die Versuche mit Methylenblau erhielten die Tiere vorher 0,5–2 cm³ Riboflavin (10 mg/cm³) oder je 0,2 cm³ Becozym eingespritzt.

¹⁾ *E. S. G. Barron & L. A. Hoffmann*, J. Gen. Physiol. **13**, 483 (1930).

²⁾ *V. R. Potter & H. G. Albaum*, J. Gen. Physiol. **26**, 443 (1942/43).

³⁾ *Ch. Zittle*, J. Biol. Chem. **162**, 287 (1946); J. Franklin Institute **241**, 154 (1946).

⁴⁾ *W. C. Schneider*, J. Biol. Chem. **164**, 241 (1946).

Methoden.

Darstellung der Mitochondrien: Es wurde die Methode von *Leuthardt & Müller*¹⁾ mit isotonischer Kaliumchlorid- und Mannitlösung verwendet.

Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs: Sie erfolgte manometrisch nach der Methode von *Warburg* bei 38° mit Luft im Gasraum.

Messung der Succinodehydraseaktivität: Bei der Durchführung von Hemmversuchen der Succinodehydrase mit Farbstoffen gelangte die Methode von *Schneider & Potter*²⁾ zur Anwendung. Als Fermentpräparat verwendeten wir 0,1 bzw. 0,2 cm³ einer vierfach verdünnten Mitochondriensuspension. Zur Hemmung benutzten wir die Farbstoffe Janusgrün B, Toluidinblau und Pyronin in Endkonzentrationen von 10⁻³–10⁻⁶-m. Die Farbstoffe befanden sich jeweils während der ersten 10 Min. (Temperatureinstellungszeit) im Seitenarm, bevor sie zum Milieu zugekippt wurden. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von 10 Min.

Pyruvatoxydation: Das Versuchsmilieu wurde nach den Vorschlägen von *Leuthardt & Mauron*³⁾ hergestellt. Der Ansatz enthielt jeweils 0,6 cm³ eines 0,04-m. Phosphatpuffers mit einem pH von 7,42; 0,4 cm³ 0,1-m. Magnesiumsulfat; 0,3 cm³ ATP (10 Mikromol/cm³); 0,5 cm³ eines 0,05-m. Substrates; 0,3 cm³ Mitochondriensuspension; 0,4 cm³ einer 0,5-m. Kaliumchloridlösung; 0,3 cm³ der Farbstoffe in Konzentrationen von 10⁻² bis 10⁻⁶-m.; Wasser bidest. ad 3,0 cm³. Zur Absorption der Kohlensäure wurde Filterpapier in den zentralen Hohlzylinder gebracht und mit 0,4 cm³ 2-n. Natronlauge getränkt.

Als Substrate wurden Pyruvat, Fumarat, Succinat, Citrat und α -Ketoglutarat verwendet; daneben gelangte ferner Pyruvat in Mischung mit je einem der andern Substrate im Molverhältnis von 10:1 zur Untersuchung.

Durchführung der Farbstoffversuche: Nach den ersten 10 Min. Schütteln zum Temperatureausgleich wurden die Hahnen geschlossen und nach weiteren 5 Min. die erste Ablesung gemacht. Unmittelbar darauf wurde der Inhalt des Seitenarms zugekippt und nach 5 Min. (20 Min. Gesamtinkubationsdauer) wieder abgelesen. Die so ermittelten Werte wurden als Nullwerte angenommen.

Es gelangten folgende Farbstoffe zur Anwendung: Methylenblau, Janusgrün B, Pyronin und Triphenyltetrazoliumchlorid. Dabei wurde vor allem der Einfluss des Methylenblaus auf die Pyruvatoxydation untersucht. Für den sogenannten Methylenblau-effekt wurde eine Endkonzentration von Methylenblau von 10⁻⁵-m. verwendet.

SUMMARY.

1. The influence of several basic dyes on the oxygen consumption of liver mitochondria in the presence of succinate and pyruvate has been studied. The oxidation of succinate is strongly inhibited by dye concentrations above 10⁻⁴ m.

2. Addition of methylene blue (10⁻⁵ m) initially accelerates the oxidation of pyruvate, but after a variable time the oxygen consumption drops to very small values. This characteristic action of methylene blue is particularly evident when the substrate is composed of pyruvate and minute amounts of succinate, fumarate, α -ketoglutarate or citrate. In the absence of methylene blue these dicarboxylic acids have no influence on the rate of the pyruvate oxidation.

¹⁾ *F. Leuthardt & A. F. Müller*, Exper. **4**, 278 (1948).

²⁾ *W. C. Schneider & V. R. Potter*, J. Biol. Chem. **149**, 217 (1943); ferner cit. in *W. W. Umbreit*, „Manometric techniques and related methods“. Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1946, S. 95.

³⁾ *F. Leuthardt & J. Mauron*, Helv. physiol. pharmacol. acta **8**, 386 (1950).

3. The analysis of this methylene blue effect shows that there must be two superimposed actions: a) an acceleration of the respiration, analogous to the stimulation of the erythrocyte respiration in the presence of methylene blue as described by *Barron & Harrop*; b) an irreversible damage of the mitochondria by the dye, resulting in the inactivation of the respiratory system.

Lebenslauf

Am 11. Dezember 1924 wurde ich, *Bruno Exer*, in Göschenen (Uri) als Sohn des Alois Exer und der Hélène Exer-Bührer geboren. Ich bin Schweizer und in Seedorf (Uri) heimatberechtigt.

Nach Absolvierung der Primarschule in Göschenen und Löhningen (SH) besuchte ich während 3 Jahren die Realschule in Beringen (SH). Im Frühling 1939 trat ich in die Handelsschule in Neuenburg ein, die ich 1942 mit der Handelsmaturität verliess. Im März 1943 bestand ich die Aufnahmeprüfung an der Kantonsschule Schaffhausen, wo ich 1944 mein Mittelschulstudium mit der Maturität Typ C beendete.

Nach dem Militärdienst konnte ich im Januar 1945 mein Chemie-studium an der Ecole d'Ingénieurs beginnen und bestand dort im gleichen Jahr das I. Propaedeuticum, worauf ich dann an die ETH. überwechselte. Im April 1948 schloss ich mein Studium an der ETH. mit dem Diplom als Ingenieur-Chemiker ab (Diplomwahlfach: Physiologische Chemie). Im Herbst des gleichen Jahres konnte ich bei Professor F. Leuthardt an der Universität Zürich meine Spezialausbildung in Physiologischer Chemie aufnehmen. Ich besuchte die Vorlesungen von Prof. Leuthardt und von Prof. Bucher (Histologie). Am 1. Dezember 1949 wurde ich stellvertretender Assistent und bin seit 1. April 1950 als regulärer Assistent am Physiol.-Chemischen Institut der Universität tätig, wo ich auch die vorliegenden Arbeiten ausgeführt habe.

Bruno Exer

